

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 199 19 092 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**G 01 N 21/63**  
// G 01 N 21/64

21 Aktenzeichen: 199 19 092.5  
22 Anmeldetag: 27. 4. 1999  
43 Offenlegungstag: 2. 11. 2000

71 Anmelder:  
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

72 Erfinder:  
Schmidt, Stefan, Dr., 07745 Jena, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:

DE	197 48 211 A1
DE	197 45 373 A1
US	58 76 672 A
US	53 55 215 A
EP	08 41 557 A2
WO	98 57 151 A1
WO	98 48 262 A1
WO	97 11 354 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Anordnung zur optischen Auswertung eines Gegenstandsarrays

57 Anordnung zur optischen Auswertung des Gegenstandsarrays, dem in Richtung eines Detektorarrays ein vorzugsweise auswechselbares und/oder ausschwenkbares Mikrolinsenarray (MLA) sowie eine Feldlinse vorgeordnet ist, mit einer über einen vorzugsweise ausschwenkbaren Strahlteiler eingekoppelten Beleuchtung, wobei diese zwischen der Feldlinse und einem Objektiv eingekoppelt wird.

DE 199 19 092 A 1

DE 199 19 092 A 1

## Beschreibung

Es zeigen:

**Fig. 1** den vollständigen Strahlengang, beispielsweise bei der Fluoreszenzmessung

**Fig. 2** den Strahlengang bei der Absorptionsmessung

**Fig. 3** den Strahlengang bei der Lumineszenzmessung

**Fig. 4** den Strahlengang ohne MLA

## Beschreibung des Strahlengangs

Der optische Aufbau des ist in drei wesentliche Bestandteile gegliedert.

1. Ein Minilinsen-Array (MLA) (2) zur Fokussierung von Licht in kleine Bereiche (Probvolumen) der mit Probensubstanz gefüllten Näpfe (1a-1d) einer Mikrotiterplatte (MTP) (1). Das MLA (2) dient auch dem Sammeln von aus dem Probvolumen emittiertem Licht im Falle von Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Anwendungen.

2. Einer Teleskop-Anordnung der Linsen 3, 11 und eines Kollimators (14) zur Beleuchtung des Minilinsenarrays 2. Als Lichtquelle kann der Ausgang eines Lichtleiters dienen, wie in der Zeichnung dargestellt die Lampe selbst.

3. Einer Feldlinse (3) und eines Objektivs (6) zur telegen- trischen Abbildung der Pupillen des MLA (2) auf einen CCD-Array-Detektor (7).

Das Minilinsen-Array besteht aus einer regelmäßigen Anordnung kleiner Linsen oder Objektive. Vorzugsweise ist die Anordnung der Minilinsen ein rechtwinkeliges Raster. In jedem Fall ist die Anordnung der Minilinsen der Geometrie des Probenbehälter-Array bzw. der MTP angepaßt.

Die dem MLA (2) zugewandte Frontlinse (3) des Teleskops für die Beleuchtung dient gleichzeitig als Feldlinse der telegen- trischen Abbildung der MLA-Pupillen.

## 1. Der Anregungs-Strahlengang

Das aus dem Lichtleiter (15) austretende Licht wird durch einen Kollimator (14) gesammelt. Der Kollimator (14) bildet zusammen mit der kleinen, kurzbrennweitigen Teleskoplinse (11) den Lichtleiterausgang auf die Zwischenbildebene (9) des Teleskops 3, 11 ab. Die große, langbrennweitige Teleskoplinse (3) nimmt das Licht aus der Zwischenbildebene (9) auf und überführt es in ein Bündel geringer Divergenz, mit dem das MLA (2) von seiner probenabgewandten Seite her beleuchtet wird. Jede einzelne Linse (2a ... 2d) des MLA (2) fokussiert das Licht dann in einen ihr zugeordneten Napf (1a ... 1d) der Mikrotiterplatte (1).

Zwischen dem Kollimator (14) und der kleinen Teleskoplinse (11) befindet sich die Aperturblende (12) des Beleuchtungsteleskops und Abschwächungsfilter (13). Die Aperturblende (12) definiert die Form des Strahlquerschnitts und hält überflüssiges Licht aus dem Strahlengang fern. Das dient der Verminderung von Signalübersprechen und einer Verringerung des Streulichtuntergrundes im Nachweis-Strahlengang. Die Aperturblende (12) befindet sich in einer Ebene, die zur Ebene der Minilinsenpupillen konjugiert ist. Die Aperturblende (12) bildet also verkleinert den äußeren Umriss des MLA (2) nach. Die Aperturblende kann zur besseren Streulichtunterdrückung auch als Lochblenden-Array ausgeführt werden.

In der Zwischenbildebene (9) befindet sich die Feldblende (9a) des Beleuchtungsteleskops. Die Zwischenbildebene (9) wird durch die große Teleskoplinse (3) und die Linsen (2a ... 2d) des MLA (2) in die Näpfe (1a ... 1d) der MTP (1) abgebildet. Die Feldblende (9a) definiert also den Bündelquerschnitt des Lichtes innerhalb der Näpfe (1a ... 1d).

Der Anregungsfilter (10) dient dazu den Spektralbereich der Beleuchtung zu definieren.

Über den Spiegel (8) wird das von den Proben kommende Licht in den auch für die Detektion verwendeten Strahlengang eingespiegelt.

Durch die Anordnung des Spiegels 8 vor dem Objektiv 6 kann auf einfache Weise ein anderer Beleuchtungsmodus gewählt werden.

Wird das Gerät zur Fluoreszenz-Analyse eingesetzt, ist der Spiegel (8) als dichroitischer Strahlteiler ausgeführt. Der Spektralbereich des anregenden Lichts wird reflektiert, der zu detektierende Spektralbereich dagegen transmittiert. Dient das Gerät zur Detektion von Lumineszenz, kann die Einspiegelung durch Spiegel 8 und damit die Beleuchtung entfallen und der Strahlengang umfaßt nur noch den Nachweisstrahlengang, wie noch dargestellt wird.

## 2. Der Nachweis-Strahlengang

Das vom Probvolumen emittierte Licht wird durch die Minilinsen (2a ... 2d) kollimiert. Jedem Napf (1a ... 1d) der MTP (1) ist dabei eine Minilinde (2a ... 2d) zugeordnet. Das kollimierte Licht, das aus der Pupille der Minilinsen austritt, wird von der großen Teleskoplinse (3), die gleichzeitig als Feldlinse für die Pupillen-Abbildung dient, in die zur anregungsseitigen Zwischenbildebene (9) konjugierten Zwischenbildebene (4) fokussiert. In der Zwischenbildebene (4) sind also die Bilder der Probvolumina aus allen Näpfen (1a ... 1d) der MTP (1) überlagert. Die Blende (4a) definiert das beobachtete Probvolumen in jedem Napf. Vorzugsweise ist die Blende (4a) genauso groß wie die Feldblende (9a) der Beleuchtung. Die Blende (4a) ist gleichzeitig die Aperturblende der Pupillenabbildung. Die Abbildung der Pupillen der Minilinsen (2a ... 2d) auf den CCD-Array-Detektor (7) erfolgt durch das Objektiv (6).

Der Emissionsfilter (5) dient dazu den nachgewiesenen Spektralbereich zu definieren.

Die Umlenkspiegel (16, 17, 18) dienen dazu den Strahlengang in eine kompakte Form zu bringen. Hierbei ist eine Mehrfachspiegelung durch mehrere Spiegel dankbar.

## Beschreibung der Meßmodi

Grundsätzlich lassen sich verschiedene Meßmethoden auf die in der MTP befindlichen Proben anwenden. Auf der Basis des oben beschriebenen Strahlengangs können die Messungen einer Methode in mehreren Näpfen parallel durchgeführt werden. Bisher sind folgende Meßmethoden in Betracht gezogen worden:

1. Absorption
2. Fluoreszenz
3. Lumineszenz
4. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Detektion
5. Polarisations abhängige Fluoreszenz

## Absorption

Bei Absorptionsmessungen kommt nur der Anregungsstrahlengang zur Anwendung. Der Strahlteiler 8 kann gegen einen Vollspiegel ausgetauscht werden. Die Detektion des durch die Probe transmittierten Lichts erfolgt durch ein Photodioden-Array (19), das so dicht als möglich den Probenbehältern nachgeordnet ist.

Durch den oben beschriebenen Strahlengang wird die probenabgewandte Seite des MLA homogen beleuchtet, so daß jeder Napf mit der gleichen Intensität durchstrahlt wird. Das MLA ist für Absorptionszwecke so auszuliegen, daß die Begrenzungen der Näpfe die durch die Minilinsen geform-

ten Strahlbündel nicht beschneiden und das jedes Strahlbündel vollständig auf die ihm zugeordnete Empfängerfläche (19a ... 19d) des Photodioden-Arrays fällt.

Das bedeutet, daß für bestimmte MTP oder Probenbehälter auswechselbare MLA und Feldblenden 9a vorgesehen sein können, die bezüglich der Brennweiten und Krümmungsradien optimiert sind.

#### Fluoreszenz

Bei Fluoreszenzmessungen erfolgt die Anregung in der gleichen Weise wie im Falle von Absorptionsmessungen. Der Spiegel (8) wird aber durch einen dichroitischen Strahlteiler mit hoher Transmission für das von der Probe emittierte Licht ersetzt. Die Auslegung des MLA orientiert sich an der möglichst selektiven Anregung und dem Nachweis aus einem kleinen Volumen innerhalb des Napfes, d. h. eine hinreichende chromatische Korrektur ist mit einer hohen numerischen Apertur (größer gleich 0.5) verbunden.

#### Lumineszenz

Da die Probe selbstleuchtend ist kommt nur der Nachweis-Strahlengang zur Anwendung.

Der Strahlteiler 8 kann ausgeschwenkt werden.

Es besteht allgemein und auch bei der Absorptionsmessung die Möglichkeit das MLA wegzulassen und eine direkte Abbildung des MTP-Bodens auf den CCD-Array-Detektor zu erzeugen. In diesem Fall kann die gesamte Platte auf einmal ausgelesen werden unabhängig davon wieviele Nöpfe sie enthält. Das bedeutet zwar leichte Verluste an Sensitivität, jedoch können auch bei einer großen Anzahl von Kanälen alle Kanäle gleichzeitig ausgelesen werden.

#### Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Detektion

Bei der zeitaufgelösten Fluoreszenz kommt der gleiche Strahlengang zur Anwendung wie bei der Fluoreszenz.

Die Anregung erfolgt durch eine Lichtquelle, die in der Lage ist kurze Lichtpulse (ca. 1 ns) zu erzeugen, d. h. beispielsweise eine geeignete Blitzlampe. Der verwendete Detektor muß in der Lage sein nach einer Verzögerung in der Größenordnung der Dauer des Anregungspulses eine Messung mit einer Integrationszeit in der gleichen Größenordnung im Takt der Beleuchtung durchzuführen.

Hierzu ist eine Mikrochannelplateverstärkte Kamera geeignet. Gemessen wird die nach der Verzögerungszeit verbleibende Fluoreszenzintensität.

#### Polarisationsabhängige Fluoreszenz

Voraussetzung ist eine polarisationserhaltende Optik. Gemessen wird die Fluoreszenzintensität mit der zum Anregungslicht orthogonalen Polarisationsrichtung.

Hierzu können vor den Filtern 5 und 10 vorzugsweise zueinander senkrecht polarisierte Polfilter vorgesehen sein.

#### Patentansprüche

1. Anordnung zur optischen Auswertung eines Gegenstandsarrays, dem in Richtung eines Detektorarrays ein vorzugsweise auswechselbares und/oder ausschwenkbares Mikrolinsenarray (MLA) sowie eine Feldlinse vorgeordnet ist, mit einer über einen vorzugsweise ausschwenkbaren Strahlteiler eingekoppelten Beleuchtung, wobei diese zwischen der Feldlinse und einem Objektiv eingekoppelt wird.

2. Anordnung nach Anspruch 1, wobei die Beleuchtung zwischen der Feldlinse und einer vor dem Objektiv angeordneten Blende eingekoppelt wird.

3. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels der Feldlinse und dem Objektiv eine telezentrische Abbildung der Pupillenebene des MLA auf das Detektorarray erfolgt.

4. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels der Feldlinse und einer zweiten Linse eine teleskopische Anordnung zur Beleuchtung des MLA erzeugt wird.

5. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zwischen der Feldlinse und der Blende ein oder mehrere Umlenkelemente zur Faltung des Beleuchtungs und/oder Detektionsstrahlenganges vorgesehen sind.

6. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die das Gegenstandsarray vorzugsweise zur Fokuseinstellung mindestens vertikal zur Beleuchtungsachse verschiebbar ist.

7. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung die Beleuchtung intermittierend unterbrochen wird und eine zum Beleuchtungstakt synchronisierte, vorzugsweise zeitversetzte Detektion erfolgt.

8. Anordnung nach Anspruch 7, mit einer Beleuchtung über eine Blitzlampe.

9. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die MLA zur Beobachtung des vollständigen Gegenstandsarrays aus dem Strahlengang ausschwenkbar ist.

10. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Beleuchtung zur Lumineszenzdetektion ausschaltbar und/oder ihr Einkoppellement ausschwenkbar ist.

11. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Absorptionsmessung dem Gegenstandsarray in Beleuchtungsrichtung ein zweites Detektorarray nachgeordnet ist.

12. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Anpassung an unterschiedliche Meßaufgaben und/oder unterschiedliche Gegenstandsarrays das MLA gegen weitere MLA austauschbar ist.

13. Kombinationsgerät zur Erfassung der Fluoreszenz und oder der zeitaufgelösten Fluoreszenz und/oder der Lumineszenz und/oder der Absorption eines beleuchteten Gegenstandsarrays mit einem Mikrolinsenarray (MLA) sowie eine Feldlinse sowie einem Detektorarray,

mit einer über einen und einer über einen Strahlteiler eingeblendeten Beleuchtung, insbesondere nach einem der vorangehenden Ansprüche,

wobei das MLA und/oder das Detektorarray austauschbar und/oder ausschwenkbar sind und/oder der Strahlteiler ausschwenkbar ist und/oder ein weiteres Detektorarray zur Absorptionsmessung vorgesehen ist und/oder Mittel zur Fokuseinstellung auf das Gegenstandsarray vorgesehen sind.

14. Verwendung einer Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche als Reader für Mikrotiterplatten.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

# Fluoreszenz-Reader

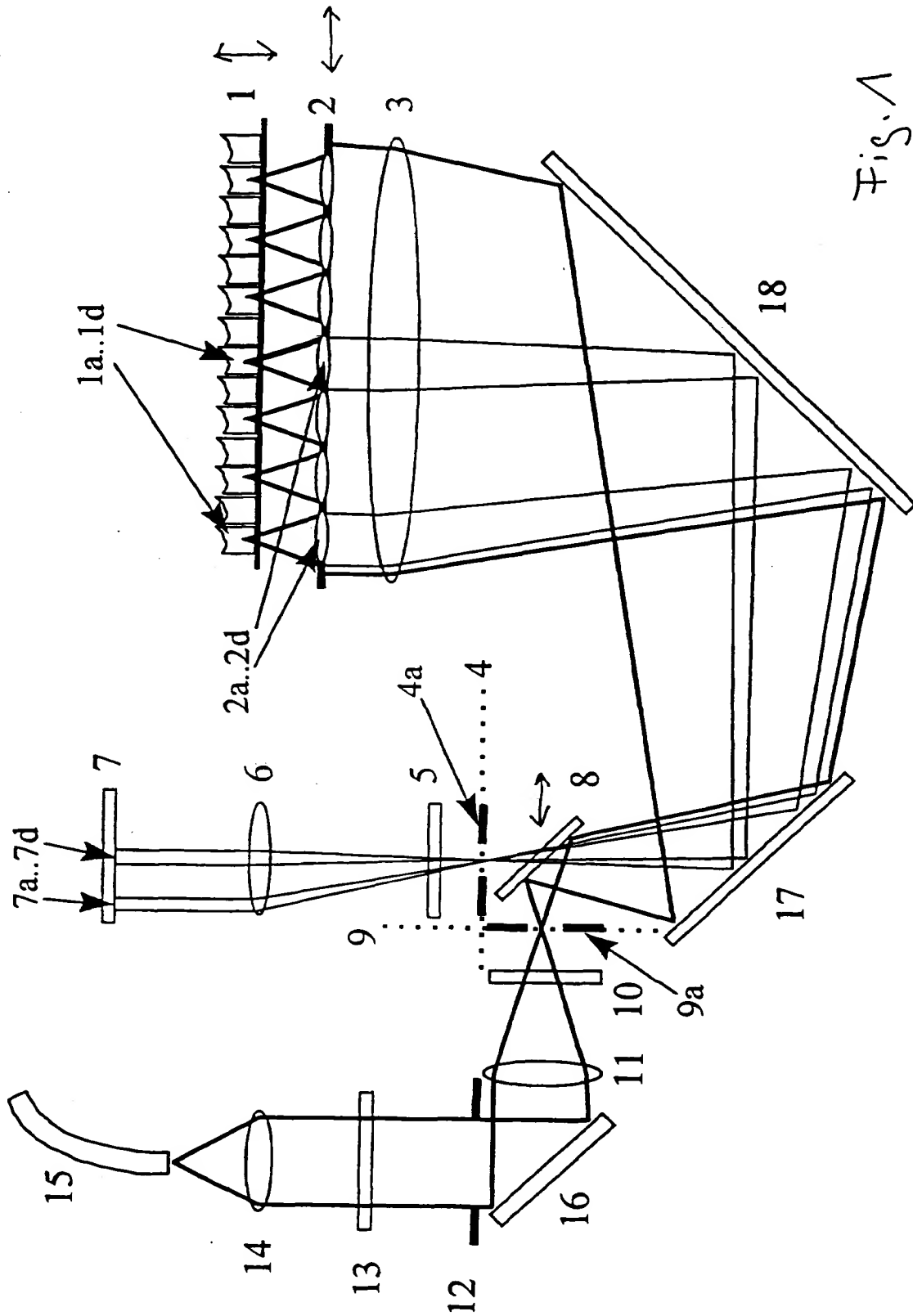
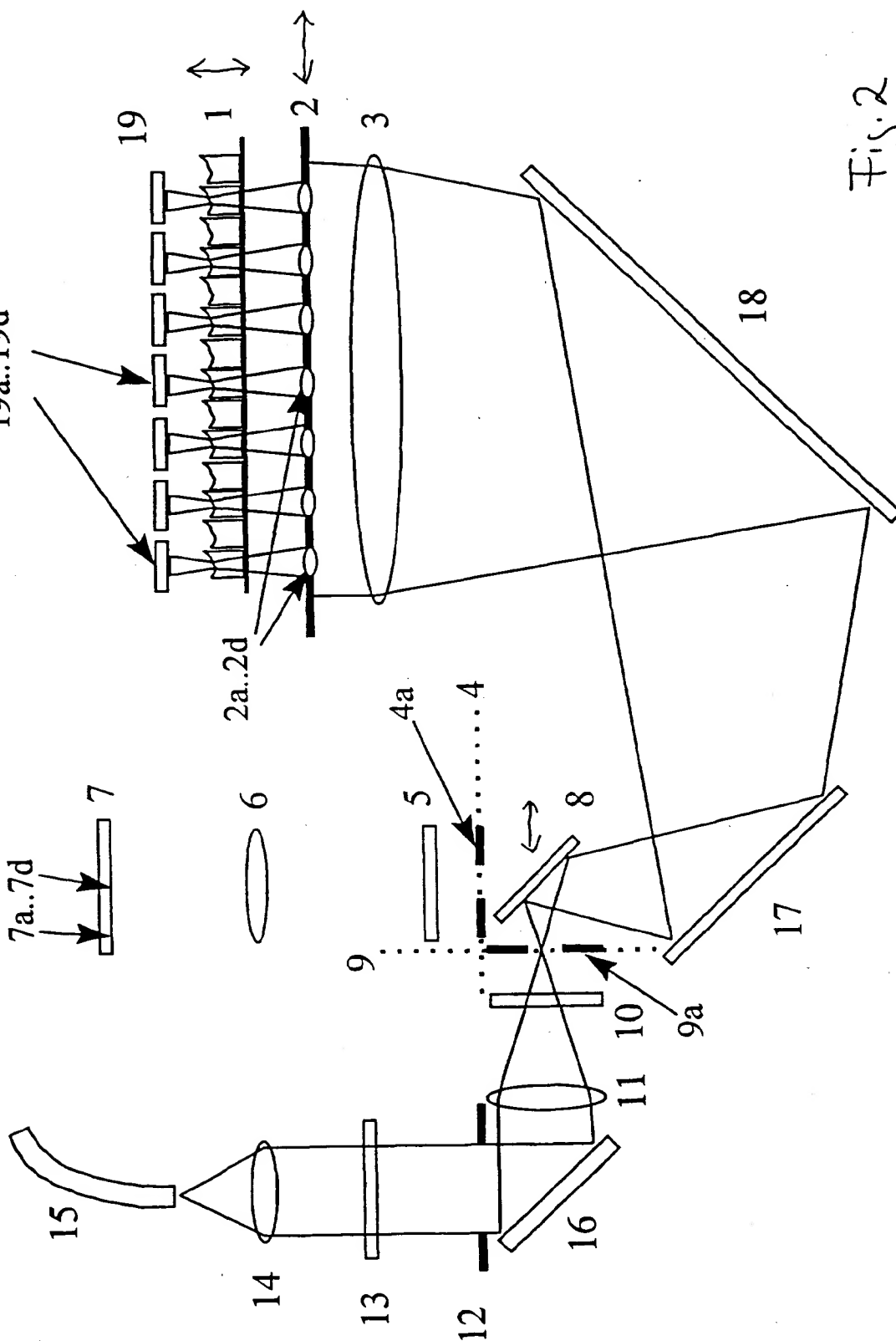
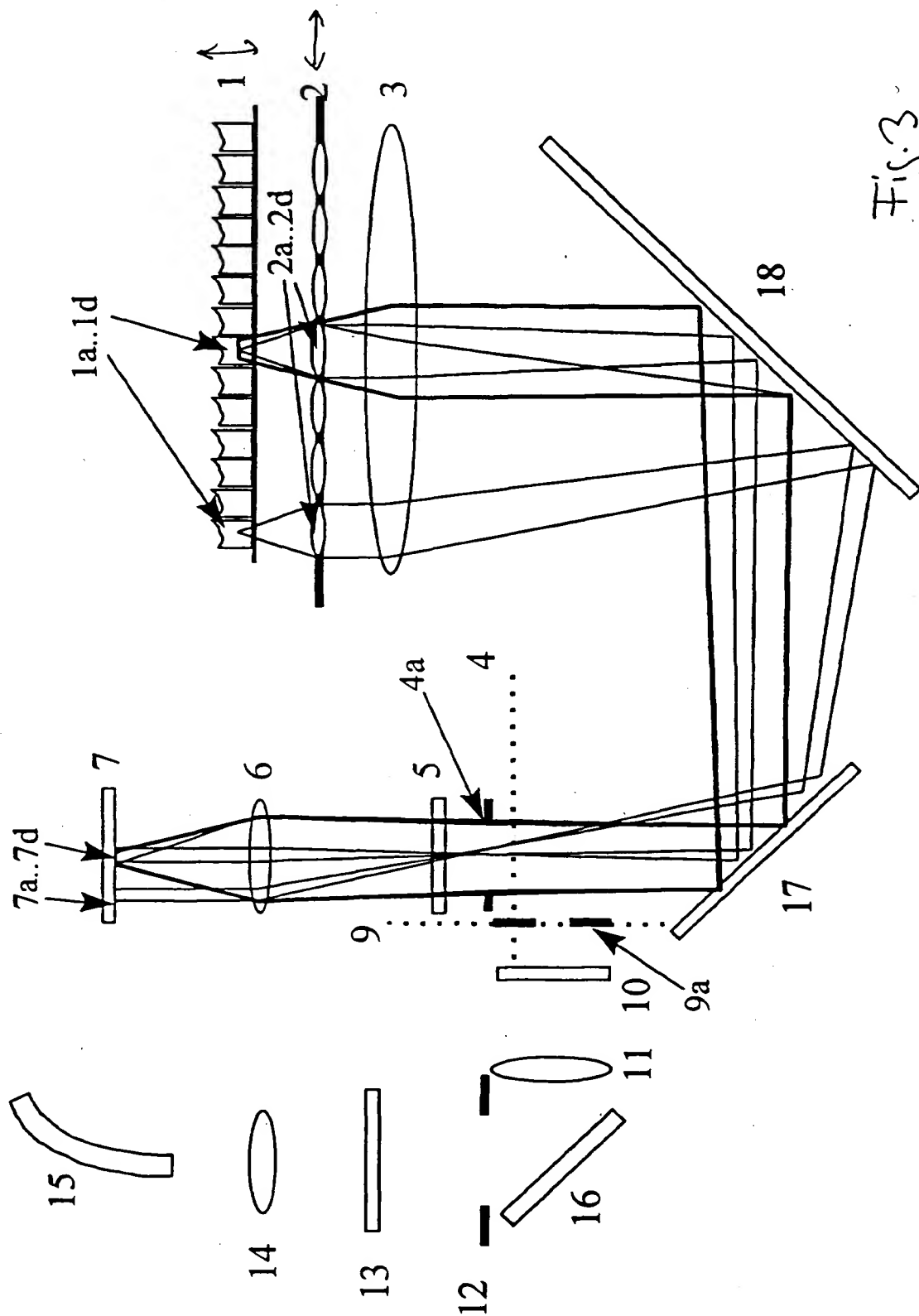


Fig. 1

Absorptions-Reader



# Lumineszenz-Reader



## Lumineszenz-Reader (direkte Abbildung)

